

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 1024 号	氏 名	平 千 明
論文審査担当者	主 査 菅 野 祐 幸 副 査 栗 田 浩 ・ 多 田 剛		
(論文審査の結果の要旨)			
<p>キメリズム解析で汎用されている short tandem repeat (STR)領域を使用した STR-PCR は、識別率が高く定量性もあるが、PCR 増幅の非特異産物であるスタッターピークや、STR 領域の長さに依存した増幅効率の影響を受けることが知られている。また、検出行程が煩雑で時間を要する。本研究において、一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNP) を用いて、移植前スクリーニング法と移植後定量解析について新たなキメリズム解析手法を構築した。</p> <p>プライマーの 3' 末端を修飾したプライマーの感度・特異性を評価し、各 SNP における塩基特異的プライマーを作成した。また、20 組のドナー/レシピエントを用いて、液滴型高速 PCR 装置による droplet-allele specific-PCR(droplet-AS-PCR)法で、移植前スクリーニングとして SNP ジェノタイピングを行った。SNP 領域は事前検討により多型頻度の高い 5 種を用いた。さらに、移植後の定量解析として、6 症例において塩基特異的定量 PCR (AS-quantitative PCR, AS-qPCR) と汎用法である STR-PCR の経時的变化を比較した。</p> <p>その結果、平千明は次の結論を得た。</p> <ol style="list-style-type: none">1. Droplet-AS-PCR により、8 分以内で SNP ジェノタイピングが可能であった。2. 5 種の SNP の各識別率は 5-50%で、5 領域全てを用いることで 95%(19/20)の識別率を得た。3. 経時的变化の追跡が可能であった 6 例中 2 例で、STR-PCR との乖離点が見られた。4. AS-qPCR は STR-PCR でみられる非特異反応や増幅効率による影響が少なく、より正確な定量結果が得られた。5. 経時的变化の追跡が可能であった 6 例中 4 例で、2 種以上の識別領域が得られた。6. 本法の総解析時間が、STR-PCR を用いた汎用法より半分以下に短縮された。 <p>これらの結果より、移植前のドナー/レシピエント識別領域選択方法として、droplet-AS-PCR を用いることで迅速で簡便にスクリーニング可能であった。識別率を 100%にするためには、人種を考慮した領域選択や組み合わせが必要である。移植後の定量解析では、AS-qPCR と STR-PCR で結果が乖離した例が見られたが、STR-PCR によるスタッターピークや増幅 STR 領域の長さに依存した PCR 増幅効率による影響が考えられ、AS-qPCR を用いることで、より正確にレシピエント DNA を検出することが可能であった。本研究で構築した droplet-AS-PCR と AS-qPCR を組み合わせたキメリズム解析は STR-PCR の欠点を補う方法であり、高い臨床的有用性が示唆された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。</p>			